

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-192724

⑪ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)8月10日

A 61 K 39/395

7252-4C

審査請求 未請求 発明の数 1 (全9頁)

⑭ 発明の名称 γ -グロブリンの液状製剤

⑮ 特 願 昭62-27031

⑯ 出 願 昭62(1987)2月6日

⑰ 発 明 者	平 尾 豊	大阪府高槻市安岡寺町1-64-9
⑰ 発 明 者	武 智 和 男	大阪府大東市川中新町25-308
⑰ 発 明 者	瓜 生 勝 寛	奈良県桜井市大福中津道3-601-32
⑰ 発 明 者	上 村 八 尋	大阪府枚方市三矢町5-18-215
⑰ 出 願 人	株式会社 ミドリ十字	大阪府大阪市東区今橋1丁目15番地の1
⑰ 代 理 人	弁理士 高 島 一	

明 細 書

(従来技術)

1. 発明の名称

 γ -グロブリンの液状製剤

2. 特許請求の範囲

(1) 非化学修飾完全分子型 γ -グロブリン含有の低電導度の溶液にソルビトールを含み約5.5±0.2のpHを有することを特徴とする静脈内投与可能な液状組成物。

(2) 非化学修飾完全分子型 γ -グロブリンの単量体含量が95%よりも大である特許請求の範囲第(1)項記載の組成物。

(3) 電導度が1mho(8℃換算)以下である特許請求の範囲第(1)項記載の組成物。

(4) ソルビトール含有濃度が1%~20%の範囲で静脈内投与可能な濃度である特許請求の範囲第(1)項記載の組成物。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は静注可能な非化学修飾完全分子型 γ -グロブリンの液状組成物に関する。

血漿蛋白成分である非化学修飾免疫 γ -グロブリンのうち、特にIgGを主成分とする非化学修飾 γ -グロブリン製剤はこれまで広く各種感染症の予防並びに治療に役立てられてきた。ところで、 γ -グロブリンは、溶液状態において容易に重合物となり、静注投与による副作用の原因ともなることから従来まで凍結乾燥の態様で製剤化されていた。また、非化学修飾完全分子型 γ -グロブリンの溶液状態における不安定性を考慮すれば、凍結乾燥を施すことが最良の方法であり、凍結乾燥の重要性は周知のことであった。

一方、液状製剤は乾燥製剤に比べると注射用蒸留水等への溶解の必要性もなく、簡便に投与できるなどの利点があるが、上記の如く、安定性に劣ることからその実用化が遅れていた。

近年、安定な液状製剤として、pH約3.5~5、イオン強度約0.001未満の条件を有する γ -グロブリン液状組成物が特開昭58-43914号にて提案されている。

特開昭63-192724 (2)

〔発明が解決しようとする問題点〕

しかし、このような強酸性の液状製剤を生体に投与した場合に、ほぼ中性に保たれている生体体液中では体液自体の緩衝作用により、 γ -グロブリンが凝集（重合）してしまう恐れがあり、必ずしも好ましいとは言えない。

従って、本発明の目的は、保存中および生体投与時のいずれにおいても γ -グロブリンの重合体の増加のない、しかも抗補体価の上昇を認めず、非化学修飾完全分子型 γ -グロブリンの活性を損なわない当該 γ -グロブリンの液状組成物（製剤）を提供することにある。

〔問題点を解決するための手段〕

上記目的は、非化学修飾完全分子型 γ -グロブリン含有の低電導度の溶液にソルビトールを含み約 5.5 ± 0.2 のpHを有することを特徴とする静脈内投与可能な液状組成物を提供することによって達成される。

本発明の非化学修飾完全分子型 γ -グロブリンとは、

することが好ましい。

かかる非化学修飾完全分子型 γ -グロブリンは、例えば、次のようにして製造される。

（原料）

出発原料としては、免疫グロブリンを含む画分が使用され、これはヒト血漿由来であって、免疫グロブリン画分を含むものであれば特に限定されない。具体的には、コーンのエタノール画分により得られる画分Ⅱ＋Ⅲ、画分Ⅱおよび、免疫グロブリンを含むこれらと同等の画分のペーストが挙げられる。また、この出発原料は、ヒト血液型抗体、カリクレイン、プレカリクレイン、IgM、IgG重合体などを含んでいてもよい。

（製造法）

①ポリエチレングリコール（PEG）処理

出発原料である γ -グロブリン含有画分を低濃度PEGで処理し、上清を回収する。

まず、出発原料を適当な水性溶媒に懸濁する。水性溶媒の溶質として、たとえば塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、酢酸、酢酸

① 自然のままでは何らの修飾や変化も受けておらず、従って γ -グロブリンのフラグメントであるFab、F(ab')₂、Fc等を含まず、

② 抗体価の低下がなく、同時に抗体スペクトルの低下もなく、

③ 抗補体作用（補体結合性）が日本国生物学的製剤基準で安全とみなされる20単位（CH₅₀値）よりも十分に低い、

という諸性状を備えたものをいう。

本発明において使用する非化学修飾完全分子型 γ -グロブリンは、自然状態のものでしかも抗補体価の低いものであれば、いかなる方法で得たものであってもよい。特に、既存の設備で製造でき、既に医薬として使用されている筋注用 γ -グロブリンを酸性処理してその凝集体を切り離して得られたものが最も効率的である。もっとも、製造上の複雑さや収量の低下を問題としないならば、非イオン系界面活性剤による処理によって抗補体作用の原因となる γ -グロブリン凝集体を除去し、抗補体価の低い γ -グロブリンとしたものを使用

ナトリウム、クエン酸、クエン酸ナトリウム等を含ませてもよい。

この懸濁液を分子量1,000～10,000（好適には約2,000～6,000）のPEGで処理する（たとえば、両者を混合する）。処理条件としては、蛋白濃度1～20w/v%（特に、5～15w/v%）、PEG濃度4～10w/v%（特に、4～8w/v%）、pH4～6（特に、4.5～5.5）、イオン強度0.0001～0.1M（特に、0.0001～0.01M）であることが好ましい。

当該処理は、通常0～4℃で30分～6時間攪拌することによって行われる。

その後、たとえば遠心分離（6000～8000rpm、10～30分間）して上清を回収する。

さらに、この上清を高濃度PEGで処理し、沈澱を回収する。

即ち、上記上清を分子量1,000～10,000（好適には2,000～6,000）のPEGにてさらに処理する（たとえば、両者を混合する）。処理条件としては、蛋白濃度1～20w/v%（特に、5～15

特開昭63-192724 (3)

w/v%)、PEG濃度10~15w/v%(特に、約11~13w/v%)、pH6~9(特に、7.5~8.5)、イオン強度0.0001~0.1M(特に、0.0001~0.01M)であることが好ましい。

当該処理は、0~4℃で30分~6時間攪拌することによって行われる。

その後、たとえば遠心分離(6000~8000rpm、10~30分間)して沈澱を回収する。

②陰イオン交換体処理

γ-グロブリン含有画分を水性溶媒に溶解後、陰イオン交換体で接触処理して非吸着画分を回収する操作であり、IgM、IgG重合体を除くために行われる。

(i) 陰イオン交換体

陰イオン交換体は陰イオン交換基を不溶性担体に結合したものであるが、陰イオン交換基としてはジエチルアミノエチル(DEAE)基、四級アミノエチル(QAE)基等を、不溶性担体としてはアガロース、セルロース、デキストラン、ポリアクリルアミド等が挙げられる。

物で接触処理して、非吸着画分を回収する操作であり、プレカリクレインまたはカリクレインを除くために行われる。

(i) 固定化ジアミノ化合物の調製

固定化ジアミノ化合物はジアミノ化合物を不溶性担体に固定化したものである。

ジアミノ化合物としては、アミノベンズアミジン、アミノベンズグアニジン、リジン、アルギニン等を用いることができる。

一方、不溶性担体としてはアガロース、セルロース、デキストラン、シリカゲル、ガラス等が利用される。

固定化は公知の方法に準じればよい。たとえば、アガロース、セルロース等は、たとえばCNBr活性化法により、またシリカゲル、ガラス等はオキシラン法により、ジアミノ化合物を固定化することができる。

(ii) 処理方法

γ-グロブリン含有画分を、蛋白濃度1~15w/v%(特に、3~10w/v%)とし、pH5

(ii) 処理方法

γ-グロブリン含有画分を適当な水性溶媒に溶解する。水性溶媒はpH5~8、低イオン強度、好ましくは0.01~0.2Mの水溶液であり、前記①のPEG処理と同様の溶質を含んでいてもよい。蛋白濃度としては1~15w/v%(特に、3~10w/v%)が好ましい。

さらに、上記水性溶媒で平衡化した陰イオン交換体と接触処理する。その処理に際してはバッチ法、カラム法のどちらを用いてもよい。

たとえば、バッチ法では、陰イオン交換体1mlに対してγ-グロブリン溶液10~100ml程度の割合で両者を混合し、0~4℃で30分~2時間程度攪拌した後、遠心分離(6000~8000rpm、10~30分間)して上清を回収する。

カラム法でも、陰イオン交換体1mlに対してγ-グロブリン溶液10~100ml程度の割合で両者を接触させ、非吸着画分を回収する。

③固定化ジアミノ化合物による処理

γ-グロブリン含有画分を固定化ジアミノ化合

~8(特に、pH6~7)、イオン強度0.01~0.2M(特に、0.05~0.15M)の条件下で固定化ジアミノ化合物と接触処理する。その際、バッチ法、カラム法のいずれもが好適に使用される。

たとえばバッチ法では、固定化ジアミノ化合物1mlに対して画分10~100ml程度の割合で両者を混合し、0~10℃、好ましくは0~4℃で30分~4時間、好ましくは40分~2時間程度攪拌した後、遠心分離(6000~8000rpm、10~30分間)して上清を回収する。

カラム法でも、固定化ジアミノ化合物1mlに対して画分10~100ml程度の割合で両者を接触させ、非吸着画分を回収する。

④固定化ヒト血液型物質処理

γ-グロブリン含有画分を固定化ヒト血液型物質で接触処理して、非吸着画分を回収する操作であり、ヒト血液型抗体を除くために行われる。

(i) 固定化ヒト血液型物質の調製

固定化ヒト血液型物質はヒト血液型物質を不溶性担体に固定化したものである。

特開昭63-192724(4)

ヒト血液型物質の調製は、公知の方法を用いればよい。たとえば、ヒトA、B、ABまたはO型の赤血球を低張溶液中で溶血、または超音波処理した後、硫酸分画法またはPEG分画法により精製すること等により得られる。

さらに、このヒト血液型物質は生理的食塩液に溶解後、夾雑するウイルスの不活化に有効とされている、例えば、約50～70℃、好ましくは約60℃で7～13時間、好ましくは約10時間、または約80～130℃、好ましくは約95℃～約121℃で約1～40分、好ましくは2～30分間加熱処理する。その後、遠心分離して不溶物を除去し、蒸留水に対して透析して、各ヒト血液型物質を得る。

一方、不溶性担体としてはアガロース、セルロース、デキストラン、シリカゲル、ガラス等が用いられる。

固定化は公知の方法に準じればよい。例えば、アガロース、セルロース等はCNBr活性化法により、シリカゲル、ガラス等はオキシラン法により

ヒト血液型物質を固定化できる。

(ii) 処理方法

r-グロブリン含有画分を蛋白濃度1～15w/v%（特に、3～10w/v%）とし、pH5～8（特に、6～7）、イオン濃度0.01～0.2M（特に、0.05～0.15M）の条件下で、上記水性溶媒で平衡化した固定化ヒト血液型物質と接触処理する。その際、バッチ法、カラム法のどちらを用いてもよい。

例えばバッチ法では、固定化ヒト血液型物質1mlに対して溶液10～100ml程度と混合させ、0～10℃、好ましくは0～4℃で、30分～4時間、好ましくは30分～2時間程度攪拌した後、遠心分離（6000～8000rpm、10～30分間）して上清を回収する。

カラム法でも、固定化ヒト血液型物質1mlに対して処理対象溶液10～100ml程度を接触させ、非吸着画分を回収する。

⑤ 加熱処理

安定化剤の存在下に免疫グロブリンの抗体活性

の減少は最小限にとどめるが、夾雑するHBウイルス、AIDSウイルス等は完全に不活化する条件下で加熱処理する。加熱処理は、含湿度3%以下の乾燥状態、（即ち、乾熱処理）、または溶液状態、即ち免疫グロブリンの水溶液状態（即ち、液状加熱処理）で行う。

安定化剤としては、いずれの処理の場合も、二糖類（例、サッカロース、マルトース）、糖アルコール（例、ソルビトール、マンニトール）が好適に例示される。

安定化剤の添加量は、乾熱処理法では、二糖類、糖アルコール等を0.5～5w/v%（好ましくは、1～3w/v%）、液状加熱処理法では二糖類、糖アルコール等を10w/v%以上（好ましくは10～20w/v%）を用いることが好適に例示される。

加熱の対象となる免疫グロブリンの量は、乾熱処理では、蛋白量として1～10w/v%（好ましくは3～7w/v%）となるように調整することが好適である。液状加熱処理では、蛋白量とし

て0.1～30w/v%（好ましくは5～20w/v%）に調整することが好ましい。

加熱処理は、乾熱処理の場合、安定化剤を添加後、要すれば除菌濾過し、たとえば凍結乾燥などによって含水率3%以下、好ましくは1%以下とする。凍結乾燥の条件としては0.5mmHgの真空下、20～40℃で24～96時間程度が例示される。次いで、たとえば50～70℃（好ましくは60℃程度）、10～200時間（好ましくは50～100時間程度）で処理する。

また、本加熱処理工程は不活性ガス雰囲気下で行うことにより、加熱時の安定性をより高めることができる。不活性ガスとしては例えば、窒素ガス、アルゴン、ヘリウムなどが挙げられる。

液状加熱処理の場合は水溶液のpHを4.5～6.5、好ましくはpH5～6に調整し、液状加熱処理法ではたとえば50～70℃（好ましくは60℃程度）で10分～20時間（好ましくは10時間程度）処理される。

上記の操作を目的に応じて、適宜組み合わせ

特開昭63-192724 (5)

当該 γ -グロブリンの製造（精製）のために用いることができる。

好適な具体例としては、①液状加熱処理→②PEG処理→③血液型物質処理→④陰イオン交換処理などの処理工程を用いることができる。

（液状組成物の調製）

得られた非化学修飾完全分子型 γ -グロブリンを常套手段によって1～10w/v%（好ましくは3～7w/v%）になるように水溶液に調整し、さらにソルビトール1～20w/v%（好ましくは、2～10w/v%）、pH5.5±0.2（好ましくは約5.5）、低電導度、好ましくは電導度1mmho以下（特に、0.6mmho以下、共に8℃換算）になるように、自体既知の手段にて調整した後、通常の製剤化技術に基づいて、除菌濾過、分注等を行う。かくして、静脈内投与可能な非化学修飾完全分子型 γ -グロブリン液状組成物（製剤）が調製される。

（作用・効果）

本発明により、長期保存時はもとより生体内投

与時においても γ -グロブリンの重合体の増加のない、しかも抗補体化の上昇を認めず、かつ長期保存時において外観・性状を良好に保ちうる安定な非化学修飾完全分子型 γ -グロブリンの液状組成物（製剤）が提供される。

（試験例・製造例）

以下の試験例および製造例によって本発明をより具体的に説明する。なお、試験例において、試験は次の方法によって行った。

（試験方法）

外観性状としては、濁りが問題となることから0.0.600nmの吸光度を測定した。

重合体の定量は高速液体クロマトグラフィーで分析した。

抗補体価の測定は、カバットとマイヤーの方法〔Experimental Immunochimistry, 225 (1961)〕および西岡、岡田の方法〔免疫の生化学、103、昭46（共立出版）〕に準じた。即ち、100単位の補体が試料を加えることによって何単位に減少するかを測定し、その減少単位を抗補体価とし

て表わした。

麻疹抗体価は Hemagglutination Inhibition Test法により測定し、国際単位（IU/100mg）で表わした。

試験例1

非化学修飾完全分子型 γ -グロブリンを使用し、各種条件に調製した液状組成物を、56℃で60分間加熱処理、その安定性を調べた。

(1) 安定化剤

γ -グロブリン濃度5w/v%、電導度1mmho（8℃換算）、pH5.5、安定化剤濃度5w/v%とした上で各種安定化剤を添加した液状組成物を試験に供した。安定化剤としてソルビトールがよい結果を示した。

（以下余白）

表1

安定化剤	外観	E _{600nm}	重合体 (%)
グルコース	×		
ガラクトース	×		
サッカロース	○	0.013	28.62
ラクトース	×		
マルトース	×		
ソルビトール	○	0.015	4.58
マンニトール	△	0.024	
アルブミン	×		
無添加	加熱	×	
	非加熱	○	0.004
			0.00

○：異状なし、△：弱い着色又は濁り、

×：強い着色又は濁り

(2) pH

γ -グロブリン濃度5w/v%、電導度1mmho（8℃換算）、安定化剤（ソルビトール、サッカ

特開昭63-192724 (6)

コース) 濃度 5 w/v %とした上で、各種 pH に調整した液状組成物を試験に供した。γ-グロブリンはソルビトールについて、pH 5.5 程度において特に安定であった。

表 2

pH	ソルビトール		サッカロース	
	外観	重合体 (%)	外観	重合体 (%)
3.5	○	>10	○	>10
4.0	○	>10	○	>10
4.5	○	>10	○	>10
5.0	○	5.38	○	>10
5.5	○	4.24	○	>10
5.5 (非加熱)	○	0.00	○	0.00
6.0	○	5.28	○	>10
7.0	△	—	△	—
8.0	×	—	×	—
9.0	△	—	△	—
10.0	○	>10	○	>10

○：無色澄明、△：微濁、×：白濁

た。ソルビトール濃度の増加とともにγ-グロブリンの安定性は増した。

表 4

ソルビトール濃度 w/v %	外観	重合体 (%)
0	×	—
1	×	—
2	○	12.24
5	○	4.06
8	○	3.29
10	○	2.34
15	○	0.10
20	○	0.03

○：無色澄明、×：白濁

試験例 2

非化学修飾完全分子型 γ-グロブリン 5 w/v %、ソルビトール 5 w/v % (生理的等張のため)、pH 5.5 および電導度 0.5 mmho (8℃換算) とした

(3) 電導度

γ-グロブリン濃度 5 w/v %、ソルビトール 5 w/v %、pH 5.5 とした上で、各種電導度に調整した液状組成物を試験に供した。電導度 1 mmho 以下で γ-グロブリンは特に安定であった。

表 3

電導度 (mmho (8℃換算))	外観	重合体 (%)
0.5 (非加熱)	○ (0)	4.20 (0.00)
1	○	7.10
2	×	
5	×	
10	×	

○：無色澄明、×：白濁

(4) 安定化剤濃度

γ-グロブリン濃度 5 w/v %、電導度 0.5 mmho (8℃換算)、pH 5.5 とした上で、ソルビトールを各種濃度に添加した液状組成物を試験に供し

液状組成物を調製した。この組成物は調製時には、次の性状を有するものであった。

外観性状：無色澄明

重合体 (%)：0.00

抗補体価 (CH₅₀/ml)：8

麻疹抗体価 (1 U)：32

この組成物について保存安定性を調べた。その結果は表 5 に示した通りである。

(以下余白)

特開昭 63-192724 (7)

表 5

保存温度	外観性状			重合体(%)			抗補体価 (CH ₅₀ /ml)			麻疹抗体価 (IU)		
	1ヶ月目	3ヶ月目	6ヶ月目	1ヶ月目	3ヶ月目	6ヶ月目	1ヶ月目	3ヶ月目	6ヶ月目	1ヶ月目	3ヶ月目	6ヶ月目
11℃	無色・澄明	無色・澄明	無色・澄明	0.00	0.02	0.01	7	9	9	32	32	32
25℃	"	"	"	0.00	0.02	0.03	8	8	10	32	32	32
37℃	"	"	"	0.02	0.08	0.14	12	16	22	32	32	32

実施例 1

コーン画分Ⅱ+Ⅲペースト1kgを蒸留水10ℓにて懸濁し、pHを5.5に調整した後、遠心分離を行い、上清を回収し、上清100ml当たりソルビトールを50g(終濃度33w/v%)添加し、60℃で10時間加熱処理した。

加熱処理後、pHを5.5に調整した後、PEG#4000を終濃度が6%になるように添加し、2℃で遠心分離を行った。

得られた上清を1N-水酸化ナトリウムを用いpH8.0とした後、PEG#4000を終濃度が12%になるように加え、2℃で遠心分離を行い、沈澱画分にIgG画分を得た。

この画分を蒸留水に溶解し、このIgG溶液100mlを蒸留水で平衡化したヒト血液型物質フォルミルセルロフィンカラム3mlを通過させヒト血液型抗体を吸着除去した。この工程での吸着により血液型抗体は(1:32)から(1:2)に低下した。

この溶液にDEAE-セファデックスを添加(

50ml溶液当たり1ml)し、0~4℃の条件下、約1時間接触処理し、処理後遠心分離(7000rpm、約20分間)して上清(IgG溶液)を回収した。

このIgG溶液を蒸留水で5%IgG溶液に調整し、酢酸ナトリウムで溶液のpHを約5.5にし、さらにソルビトールを終濃度5%まで添加した。この水溶液(電導度約1mmho)を除菌濾過し静注用免疫グロブリン液状製剤を得た。

特許出願人 株式会社 ミドリ十字

代理人 弁理士 高島 一



